Aus der Klinik für Haut-und Geschlechtskrankheiten
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. H. S c h u e r m a n n

Vergleichende, elektronenoptische Untersuchungen von menschlichen und tierischen Ejakulations- und Hodenspermatozoen

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Waldemar Reinlein

aus Bamberg

Würzburg 1956

Aus der Klinik für Haut-und Geschlechtskrankheiten
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. H. S c h u e r m a n n

Vergleichende, elektronenoptische Untersuchungen von menschlichen und tierischen Ejakulations- und Hodenspermatozoen

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Waldemar Reinlein

aus Bamberg

Würzburg 1956

Tag der mündl. Prüfung:
7. Mai 1956

Referent: Professor Dr. med. H. Schuermann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

M e i n e n E l t e r n .

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.)	Geschichtliches	1
II.)	a) Das Elektronenmikroskop	2
	b) Die Wirkungsweise des Elektronenmikroskopes	5
III.)	Bisherige Erkenntnisse	6
IV.)	Einteilung des Spermatozoons	7
	a) Kopf	7
	b) Hals	9
	c) Körper	10
	d) Schwanz	11
	e) Endstück	12
V.)	Praeparationstechnik	18
VI.)	a) Eigene Untersuchungen	21
	b) Elektronenoptische Bilder und ihre Beschreibung.	23
VII.)	Zusammenfassung	30
VIII.)	Literaturverzeichnis	32

Die Mitteilung Antony van L e e u w e n h o e k s an die Royal Society im November 1677 über Beobachtungen am menschlichen Sperma auf Grund mikroskopischer Untersuchungen kann als die Geburtsstunde der Spermatologie bezeichnet werden. Leeuwenhoek hat in dieser Mitteilung die von ihm zum ersten Male beobachteten beweglichen Gebilde als "Animalcules" bezeichnet.

Bereits im Jahre 1723 schreibt F o l k e s , der damalige Präsident der Gesellschaft in London, anlässlich des Hinscheidens van L e e u w e n h o e k s über seine Entdeckung von Spermatozoen, daß diese Theorie der Fortpflanzung eine absolut neue Wendung gegeben habe. Auch heute steht die Anerkennung dieser Theorie unangefochten fest und kann nicht ausdrücklich genug unterstrichen werden.

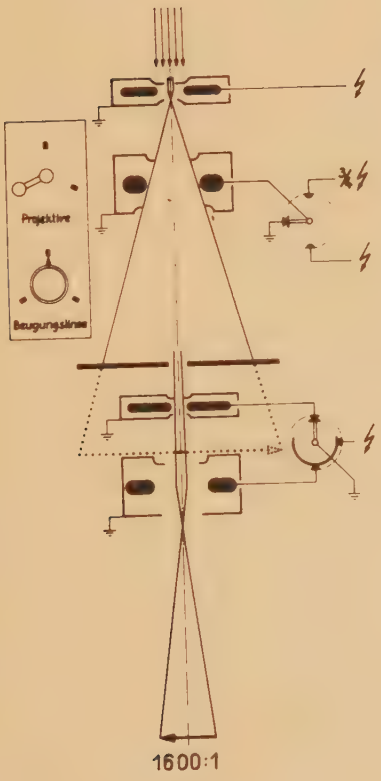
Die Beobachtung von "Animalcules" in einem Mikroskop von 200 bis 300-facher Vergrößerung wurde im Jahre 1677 mit Recht als eine große Entdeckung betrachtet. Erst in den letzten Jahren konnte dieselbe durch die e l e k t r o n e n m i k r o s k o p i s c h e F o r s c h u n g wesentlich vertieft werden.

Die Darstellung von Spermien in 100 000-facher Vergrößerung bedeutet heute keine Schwierigkeit mehr. Jedoch ist das menschliche Spermium trotzdem nicht leicht zu untersuchen, da es sich als schwer durchlässig für die Elektronenstrahlen erweist und dadurch keine detaillierten Struktureinzelheiten erkennen läßt.

Das Elektronenmikroskop unterscheidet sich vom Lichtmikroskop nicht wesentlich. Die Lichtstrahlung des Lichtmikroskopes wird im Elektronenmikroskop durch Elektronenstrahlung ersetzt und ebenso die Glaslinsen durch elektrische oder magnetische Felder. Rechnet man mit abgerundeten Zahlen, so ist zu sagen: Das Lichtmikroskop vermag Einzelheiten von Gegenständen gerade noch zu sehen, die 2/10 000 mm groß sind; das Elektronenmikroskop kann heute schon Einzelheiten sichtbar machen, die 1/10 000 000 mm groß sind.

Damit ist man in der Lage, einen Würfel, dessen Kantenlänge aus rund 4 C-Atomen besteht, im Elektronenmikroskop abzubilden, wenn der Abstand der einzelnen C - Atome, die in einer Richtung liegen, eine Größe von 3,5 Å ausmacht. Das würde in den makroskopischen Bereich übersetzt heissen, daß ein Quadrat von 1 mm Kantenlänge im elektronenmikroskopischen Bild bei einer Auflösung von 10 Å eine Fläche einnehmen würde, die ungefähr 22 Fussballplätzen entspricht.

Schematische Darstellung des AEG'ZEISS Elektronenmikroskopes



Der Strahlengang in einem Elektronenmikroskop ist dem eines Lichtmikroskopes sehr ähnlich. Wie schon gesagt tritt an Stelle der Lichtquelle eine Elektronenquelle. Sie besteht aus einem Wolframfaden, der, wie von der Radioröhre bekannt ist, in glühendem Zustand Elektronen aussendet. Diese Elektronen werden nun von einem starken elektrischen Feld von über 50 000 Volt beschleunigt und scharf gebündelt auf das Objekt geworfen, das sie teilweise durchdringen. Gleich hinter dem Objekt befindet sich -wie beim Lichtmikroskop- das Objektiv, dessen Linsen für Elektronen aber nicht mehr aus Glas oder Quarz angefertigt werden können, da zur Ablenkung des Strahles im Elektronen - mikroskop elektrische oder magnetische Felder benützt werden müssen. Dieses Objektiv entwirft nun zunächst ein schwach vergrößertes Bild. Einen kleinen Ausschnitt dieses Bildes vergrößert man mit den beiden elektrischen Projektionslinsen weiter auf den Leuchtschirm oder auf die Fotoplatte. Die beiden Projektionslinsen lassen sich dabei wahlweise oder gemeinsam einschalten, wodurch sich verschiedene Vergrößerungen erzielen lassen. Schließlich kann zur Beobachtung des Leuchtschirmes bei dem AEG'ZEISS-Elektronenmikroskop noch ein lichtstarkes Fernrohr vorgeschwenkt werden, so daß bis 320 000-fache Vergrößerungen zu erreichen sind.

Im Elektronenmikroskop werden an Stelle von Lichtstrahlen Elektronen zur Abbildung benutzt. Elektronen, die kleinsten Träger negativer Ladung, die durch ein starkes elektrisches Feld beschleunigt werden, haben Welleneigenschaften wie das Licht, nur daß die Wellenlänge etwa 10 000 mal kürzer ist als die des sichtbaren Lichtes. Die verhältnismässig große Wellenlänge des sichtbaren Lichtes ist aber gerade die Ursache für die Grenze des Auflösungsvermögens der Lichtmikroskope. Unter dem Auflösungsvermögen eines Mikroskopes versteht man den kleinsten Abstand, den zwei Punkte im Blickfeld aufweisen müssen, um sie noch als getrennte Bild-Punkte erkennen zu können. Die Verwendung von Elektronenstrahlen bringt allerdings zwei Schwierigkeiten mit sich: Erstens können sich Elektronen nur im Hochvakuum frei fortbewegen, da die Luftmoleküle sich ihnen in den Weg stellen, weshalb man das Elektronenmikroskop luftleer pumpen muß. Infolgedessen müssen die zu beobachtenden Objekte und die Fotoplatten ein- und ausgeschleust werden, ohne daß Luft in das Gerät eindringt. Eine sinnreiche Automatik ermöglicht diesen Vorgang in einer halben Minute. Zweitens kann man Elektronen nicht sehen. Es ist deshalb dafür zu sorgen, daß die Elektronenbilder in für unser Auge sichtbare Lichtbilder verwandelt werden. Dies wird dadurch erreicht, daß entweder das Elektronenbild auf einen Leuchtschirm fällt, der unter der Wirkung der auftreffenden Elektronen aufleuchtet und dadurch die Beobachtung ermöglicht, oder daß man das Elektronenbild auf einer Fotoplatte entwirft, die für Elektronen ebenso empfindlich ist wie für Licht. Das Bild kann dann in der üblichen Weise entwickelt und vergrößert werden.

Eine genaue Strukturanalyse der Spermatozoen ist durch lichtoptische Methoden nicht zu erreichen, und so war es nur mit Hilfe des Elektronenmikroskopes möglich, sich bessere morphologische Kenntnisse über den feineren Bau der Spermatozoen zu verschaffen. Die ersten Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden von Seymour und Benmoshe 1941 an menschlichem Samen, von Schmitt, Hall und Jakus 1943, von Bretschneider 1947 und von Sanders 1948 an tierischem Samen durchgeführt. Es konnten dabei durch verschieden angewandte Präparationstechnik Erkenntnisse über den morphologischen Feinbau gewonnen werden.

Da die Elektronenstrahlen den Samenfaden wegen seiner Dicke und Dichte nur schwer durchdringen, wurde es nötig, die Spermien durch chemische und physikalische Prozesse vorzubereiten, um einen Einblick in ihre innere Struktur zu erhalten. Dabei konnte durch Quellung, Anlagerung von Schwermetallen oder Auslösung einzelner Protoplasmabestandteile eine strukturelle Differenzierung erzielt werden.

Bretschneider z.B. verwandte hypo- und hypertonische Lösungen. Wu und McKenzie ließen NaOH-Lösungen verschiedener Konzentration auf die Spermien einwirken. Andere Untersucher wie Hammen, Schultz-Larsen und Carlsen gebrauchten Lantanacetat oder Sodalösung zur Differenzierung der Spermien. Mölbert verwandte Dichloraethylen. Andererseits wurde versucht, durch möglichst weitgehende Erhaltung der Struktur neue Erkenntnisse zu gewinnen. Schnall erzielte durch eine isotonische Osmiumsäure-Fixation gute Ergebnisse.

In seinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen beschreibt S c h n a l l die menschliche Spermienzelle und gliedert sie in 5 Teile auf: Kopf, Hals, Körper, Schwanz und Endstück.

K o p f .

Ebenso wie unter dem gewöhnlichen Mikroskop zeigt der Spermienkopf unter dem Elektronenmikroskop ovale bis elliptische Formen. Bei elektronenoptischer Beobachtung erscheint das Größenverhältnis zwischen Akrosom und Kern umgekehrt wie beim gewöhnlichen Mikroskop.

S c h n a l l führt aus, daß bei nahezu allen seinen Untersuchungen die Zelle einen großen Kern und ein kleines Akrosom aufweist, wobei beide im ungefähren Verhältnis von 2:1 zueinander stehen. Bei elektronenoptischen Untersuchungen kommt man somit zu einem Ergebnis, das im direkten Gegensatz zu den früheren Ausführungen steht, die nur mit Hilfe des Lichtmikroskopes gemacht wurden.

Das dünne Akrosom und der viel dickere Kern sind infolge ihrer Schattenbildung leicht zu erkennen.

Nach den Beobachtungen von S c h n a l l finden sich im Akrosom in der Regel eine bis drei Vakuolen, in seltenen Fällen bis zu sechs. Im Kernteil des Kopfes menschlicher Spermatozoen sind gewöhnlich keine Vakuolen sichtbar, jedoch hat S c h n a l l auch hier in vereinzelten Fällen zwei oder drei Vakuolen gefunden. Diese Vakuolen waren sowohl bei Zellen, die mit chemischen oder physikalischen Mitteln präpariert waren, als auch bei normalen Zellen sichtbar. Es ist durchaus möglich, daß diese Vakuolen gasartige Endproduktanhäufungen sind, die sich aus der Spermienzelle gelöst haben.

Als S c h n a l l einen intensiven Elektronenstrahl auf die Stützmembran einwirken liess, hatte dies zur Folge, daß die Membran rupturierte, sich aufkräuselte und das Spermatozoon nun von oben nach unten gesehen werden konnte.

B r e t s c h n e i d e r teilte den Spermatozoonkopf in 7 horizontale Ebenen auf, um vergleichsweise die Anzahl der Vakuolen bestimmen zu können. S c h n a l l lehnt dies jedoch ab. Er glaubt, daß die Anordnung im menschlichen Spermienkopf zu veränderlich und ziellos sei, um eine solche Schematisierung zu rechtfertigen.

Bei Bullenspermatozoen fand S c h n a l l die größte Anzahl Vakuolen im hinteren Teil des Kopfes. Vereinzelt konnte beobachtet werden, wie sich eine Vakuole vom Akrosom löste. Diese selten beobachtete Erscheinung könnte auch ein Kopfdefekt sein, obwohl S e y m o u r und B e n m o s h e diesen für einen Saugapparat halten, der vermutlich dem Spermium die Fähigkeit zum Eindringen ins Ei verleiht.

Die galea capitis erscheint dünn und klar durchsichtig in ihrer Struktur und sitzt kappenförmig auf dem Akrosom. Obwohl bei der Mehrzahl der elektronenoptisch untersuchten Spermienzellen die galea capitis unsichtbar ist, behauptet Schnall, sie häufig gesehen zu haben, so daß ihr Vorhandensein als ein Wesensmerkmal der menschlichen Spermienzelle angesehen werden kann.

Bei ihrer elektronenmikroskopischen Arbeit fanden R e e d und R e e d die galea capitis in Bullenspermatozoen. Es war ihnen aber nicht möglich, das Vorhandensein der galea capitis in der menschlichen Spermienzelle nachzuweisen.

Auch B l o m und B a y l o r , N a l b a n d o v und C l a r k erkannten die galea capitis bei Bullenspermatozoen. R a n d a l l und F r i e d l a e n d e r bewiesen, daß die galea capitis ein wesentlicher Teil des Widderspermatozoons ist und beschrieben ihre drei Komponenten:

1. eine durchsichtige Membran
2. eine faserige Struktur
3. einen kugelförmigen Teil.

Eine frei abgetrennte galea capitis im menschlichen Spermatozoon, wie sie von W i l l i a m s beschrieben wurde, ist bis jetzt noch nicht mit dem Elektronenmikroskop gesehen worden.

H a l s .

Im Lichtmikroskop ist nur sehr wenig vom Hals des Spermatozoon zu sehen. W i l l i a m s berichtet, daß im Lichtmikroskop sich der Hals als axialer 0,5 Mikron großer, hüllenloser Faden zeigt.

Im Elektronenmikroskop wird eine komplexe Halsstruktur augenscheinlich. Eine Hülle umgibt 2 dicke Fäden, welche ihren Ursprung von der Kopfbasis aus nehmen. Der Hals scheint einen größeren Durchmesser als der Körper zu haben. Nur bei Verletzung der Halshülle ist die Verbindung der beiden Fäden mit dem Kopfteil sichtbar. Diese beiden Fäden scheinen sich innerhalb des Halsteiles zu verbinden. Häufig laufen sie auch zusammen durch den Körper und verbinden sich erst beim Übergang in das Schwanzstück. Je mehr der Halsteil in der Struktur der Spermienzelle verletzt ist, desto deutlicher sind die beiden Fäden sichtbar.

C u l p und B e s t beschrieben diese faszikulären Gebilde in menschlichen Spermatozoen. B r e t s c h n e i d e r zeigte sie im Halsteil von Bullen-,Pferde- und Hundespermatozoen auf. Er erkannte, daß diese Fibrillen von einer Bindesubstanz zusammengehalten werden, die durch proteolytische Behandlung aufgelöst werden kann.

R a n d a l l und F r i e d l a e n d e r führten bei der Untersuchung von Widderspermatozoen aus, daß die Verbindung von Kopf- und Halsstück aus drei von einer Hülle umgebenen Faszikeln besteht,und daß diese Fasc̈ikel sich kontinuierlich, vom Kopf ausgehend, durch Hals- und Körperteil erstrecken.

K ö r p e r .

Das Verbindungsstück von Halsteil und Schwanz ist der Körper des Spermatozoons. Er erscheint im elektronenoptischen Bild etwas dicker als der Schwanzteil. Eine große Windung, die als Jensenscher Spiralkörper bekannt ist, -nach Carl Oluf J e n s e n , der sie im Jahre 1887 als erster beschrieb-, umgibt den Doppelzentralfaden und bildet mit ihm einen Winkel zwischen 45 und 60 Grad. Auf beiden Seiten des Körpers ist oft eine wechselnde, wellenförmige Silhouette zu sehen, die diese große Windung andeutet. Die Anzahl der Windungen dieses Spiralkörpers ist sehr verschieden.
S c h n a l l zählte bei menschlichen Spermatozoen 6-12 derartige Windungen.

R e e d und R e e d berichten, daß sie bei menschlichen Spermatozoen 10-12 solcher Spiraldrehungen erkannten.

B r e t s c h n e i d e r fand 10-12 Windungen bei Bullenspermatozoen und 15-17 bei Hundespermatozoen.

Diese Windungen sehen einer Anzahl schräger Streifen sehr ähnlich. An der Übergangsstelle zwischen Körper und Schwanzteil ist der Jensensche Ring deutlich sichtbar.

Gelegentlich bemerkt man auch cytoplasmatische Ausstülpungen des Körpers. Es wird aber allgemein angenommen, daß es sich hier um unreife Formen handelt.

S c h n a l l erklärt, er habe in vielen elektronenoptischen Abbildungen die Austrittsstelle der beiden oben beschriebenen Faszikel aus dem Kopfteil oft gesehen und konnte auch ihren Verlauf durch Körper-und Schwanzteil verfolgen.

S c h w a n z .

Im elektronenoptischen Bild ist der zentrale Axialfaden im Schwanzteil von einem deutlich sichtbaren, transluzenten Schatten umgeben. Der Schwanzteil ist im Elektronenmikroskop am klarsten zu sehen, wenn die Spermatozoen vorher einer Formaldehydpräparation oder einer Schrägbedampfung mit Gold unterzogen wurden.

Nach vorherrschender Meinung wird der zentrale Axialfaden auf ähnliche Art gebildet wie ein Spiraldraht.

Eine die Fibrillen umgebende Hülle verengt sich scharf zum Ende des Schwanzteiles hin, verschwindet dann ganz und läßt nur das blosse Terminalfilament zurück.

B r e t s c h n e i d e r glaubte, daß sich im Bullenspermatozoon drei Spiralfibrillen befinden, die den unversehrten Schwanz ungefähr 150 mal umwinden.

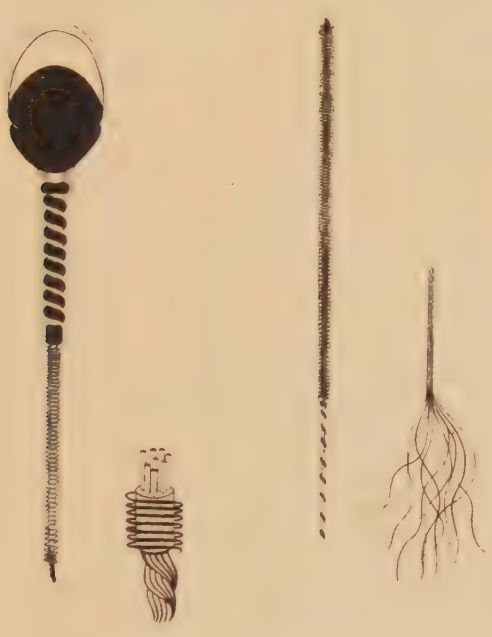
R a n d a l l und F r i e d l a e n d e r beschäftigten sich sehr eingehend mit dem komplexen Aufbau dieser Axialfibrillen im Widderspermatozoon. Sie fanden durch elektronenoptische Untersuchungen heraus, daß der zentrale Axialfaden im Schwanzteil aus 12 Fibrillen besteht, von denen sich jede aus 2 Fäden zusammensetzt, die ihrerseits von 2 weiteren Fäden umwunden sind. Der ganze zentrale Axialfaden setzt sich also aus 48 Filamenten zusammen. Ebenfalls stellten beide Forscher schon früher fest, daß der ganze Schwanzteil sowohl bei Bullen -als auch bei Widderspermatozoen von einer Doppelwindung umgeben wird.

E n d s t ü c k .

Das Endstück ist in elektronenoptischen Bildern sowohl als Einzelfaszikel zu sehen als auch in Form von 2-11 Fibrillenfäden. Deshalb erhebt sich auch die Frage: Ist das Endstück im normalen Spermatozoon ein Faszikel, oder ist es zusammengesetzt aus einer Vielzahl von Fibrillen, die einer Eigenbewegung fähig sind?

S c h n a l l schreibt, daß er bei mehr als 1000 elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Spermatozoen in den meisten Fällen das Endstück als soliden Faszikel gesehen habe.

Er fand auch bei Spermatozoen, die durch verschiedene Präparationstechnik vorbehandelt waren, in 60 % der Fälle ein fibrilläres Endstück und in nur 40 % der Fälle ein solides. Dieses Ergebnis kann als die Folge der Vorbehandlung angesehen werden.



Schematische Zeichnung des menschlichen Spermatozoons, nach W e i s s.

Der Kopf des Spermatozoons hat bisher das größte Interesse der Untersucher gefunden. So ist die morphologische Struktur des Kopfes seit vielen Jahren durch die Arbeiten von R e t z i u s , B r o m a n , M a r c u s und S t i e v e in groben Zügen bekannt. Es steht fest, daß sich der Kopf aus zwei verschiedenen Teilen zusammensetzt. Er besteht aus dem Kern, der sich bei menschlichen Spermatozoen als kugelförmiges Gebilde im hinteren Teil des Kopfes findet, und dem vorderen Teil des Kopfes, der aus dem Cytoplasma entwickelt wird und das sogenannte Akrosom bildet.

H a m m e n , S c h u l t z - L a r s e n und C a r l s e n beschäftigten sich mit der Morphologie des Kopfteiles menschlicher Spermatozoen, wobei sie an Samenpräparaten, bei denen die "Kritische Punkt-Methode" angewandt wurde, feststellten, daß die Undurchsichtigkeit sehr groß ist und folglich von der inneren Struktur außer einer erhöhten Absorption in der Nähe der Basis, wo vermutlich der Kern liegt, wenig zu sehen ist. Ferner gelang es ihnen, durch einen glücklichen Schatteneffekt eine "Körnerstruktur" an der Oberfläche des Kopfes zu zeigen, die nach ihrer Meinung zu vergleichen ist mit der Mitochondrial-Struktur, welche auf einigen älteren, teilweise hypothetischen Schemabildern des menschlichen Samentierchens illustriert ist.

Ebenso führen S c h u l t z - L a r s e n , H a m m e n und C a r l s e n aus, daß am Kopf verschiedene Membranen zu sehen sind, von denen eine -und zwar die, die den vorderen Kopfteil umgibt und durch den Randreifen mit diesem verbunden ist- der galea capitis, die bei Tieren beobachtet wurde, gleichkommt.

Hieraus ergab sich, daß tierische Spermien in morphologischer Hinsicht besser zu differenzieren sind als menschliche Spermien. B r e t s c h n e i d e r und F r i e d l a e n d e r sprechen in früheren Veröffentlichungen auch schon von einer sogenannten galea capitis, die am Kopfteil des Spermatozoons zu finden ist. Diese galea capitis wird auch in Beziehung gebracht zur Fruchtbarkeit von Haustieren, zum Beispiel zu der von Bullen und Pferden. Tierärzte haben festgestellt, daß die verminderte Fruchtbarkeit auf einem Sichlösen der galea capitis vom Kopfteil des Spermatozoons beruht. Diesbezüglich ist auf die lichtmikroskopischen Untersuchungen von B l o m hinzuweisen, der auch schon bei tierischen Spermienuntersuchungen die galea capitis vom Kopfteil gelöst vorfand und ausführte, daß dies eine Degenerationserscheinung sei. Diese werde z.B. hervorgerufen durch Nichtverwendung eines Bullen zur Zucht, wobei es zu einer übermässigen Samenansammlung im ductus deferens kommen soll.

Außerdem konnte B r e t s c h n e i d e r bereits elektronenoptisch bei Bullenspermatozoen im Inneren des Kopfes eine Vakuole nachweisen.

Der Kopfteil tierischer Spermatozoen geht unvermittelt, ohne ein ausgeprägtes Halsstück, in das Mittel- bzw. Endstück über. Bei menschlichen Spermatozoen dagegen ist ein ausgeprägtes Halsstück zu finden.

Einige Untersucher glauben annehmen zu können, daß die 0,2-0,4 μ großen Gebilde, die in dem Halsstück zu finden sind und als runde "granulae" imponieren, Mitochondrien seien. Es war aber bisher weder durch Färbemethoden noch im elektronenoptischen Durchstrahlungsbild möglich, ein genaues morphologisches Bild der Feinstruktur eines Spermatozoonkopfes zu erhalten. Eine morphologische Identifizierung wurde erst möglich, als es gelang, Dünnschnitte herzustellen, deren Dicke unter 200 Å liegt. Somit war erreicht, das Auflösungsvermögen eines Gewebedünnschnittes unter 50 Å Dicke zu erhalten. Nur durch diese Auflösung ist es möglich, daß sowohl Polypeptide als auch Grenzschichten von nur einigen Molekülagen zu erkennen sind.

Der Strukturanalyse zugänglicher ist der Bewegungsapparat des Samenfadens. Folgender Aufbau konnte festgestellt werden: Eine Membran umhüllt Fibrillen, die in einer Spiralwindung das Protoplasma umgeben. Im Inneren des Protoplasmas, gleichsam als Axialfaden, ist je nach Herkunft eine verschiedene Anzahl feiner Fibrillen zu finden. Die menschlichen Spermatozoen haben einen ausgesprochenen "Nackenteil", dessen Differenzierung nur durch die Dünnschnittechnik möglich ist.

Die vergleichenden Untersuchungen von Hodenspermatozoen und Ejakulationsspermatozoen sind für die bisher noch nicht gelöste Problemstellung der künstlichen Insemination bei Verschluß der samenabführenden Wege von großer Bedeutung. Bei Tierversuchen soll nach G o e t z e die künstliche Insemination mit Hodenspermatozoen geglückt sein. Von D o e p f m e r wurden Hodenspermatozoen von Ratten, Hunden und Meerschweinchen im Hinblick auf Zahl, Modilität und Morphologie nach der Möglichkeit künstlicher Insemination untersucht. Morphologisch konnte bei diesen Untersuchungen von Hodenspermatozoen, die im Lichtmikroskop durchgeführt wurden, kein Merkmal, weder bei Bullen, Hunden und Meerschweinchen, noch bei Menschen, entdeckt werden, worin sie sich von Ejakulationsspermatozoen unterscheiden. In Fortsetzung dieser Untersuchungen wurden nun mit Hilfe des Elektronenmikroskopes vergleichende Aufnahmen von Hodenspermatozoen und Ejakulationsspermatozoen angefertigt. Dabei sollte angestrebt werden, ein analoges morphologisches Bild von Hodenspermatozoen und Ejakulationsspermatozoen zu erhalten. Durch Anwendung der Dünnschnittechnik wurde versucht, die Spermien zu analysieren.

Die Ejakulationsspermatozoen wurden per Masturbation gewonnen. Zur Gewinnung der Hodenspermatozoen wurde 1 g Hodenparenchymsubstanz in 3 ccm isotonischer Ammoniumchloridlösung in feinste Partikel zerschnitten und dann durch ein doppeltliegendes Mullstück filtriert. Diese Suspension wurde bei 2500 r.p.m. während 7 Min. ausgeschleudert und der Bodensatz zur Fixierung mit gepufferter Osmiumsäure versetzt. Nach 1/2-stündiger Osmiumsäure-Fixation bei 4 Grad C

wurde erneut ausgeschleudert und mit Tyrodelösung gewaschen. Sodann fertigten wir vom Bodensatz eine Suspension mit Aqua dest an, von der je ein Tropfen auf den elektronenmikroskopischen Objektträger, der vorher mit einer Lackfolie überzogen worden war, gebracht wurde. Nach Trocknung im Thermostaten bei 50 Grad C wurden die Präparate einer Schrägbedampfung unterzogen.

Zur Herstellung von ultrafeinen Dünnschnitten wurden Ejakulationsspermatozoen, welche durch Auszentrifugieren von frischem Ejakulat gewonnen worden waren, nach oben beschriebener Methode mit Osmiumsäure fixiert, mit Tyrodelösung gewaschen und sodann durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt und in Plexiglas eingebettet.

Ferner wurden kleine Stückchen frischen Hodenparenchyms auf gleiche Weise zur Fixation gebracht.

Die Fixationsflüssigkeit setzt sich wie folgt zusammen:

Lösung A	5 cm³	Lösung A:	Natriumacetat	9,714 g
Lösung B	1,7 cm³		Natriumchlorid	14,714 g
Hypochlorid	5,5 cm³		Auqadest.	500 cm³
Osmium-tetroxyd	0,25 g	Lösung B:	Natriumchlorid	40,3 g
Aquadest.	25 cm³		Kaliumchlorid	2,1 g
			Calciumchlorid	0,9 g
			Aquadest.	500 cm³

Die Präparate, welche durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt waren, kamen in 90%-iges Butylmethacrylat und 10%-iges Methylmethacrylat. Die Polymerisation erfolgte bei 48 Grad C, nachdem zuvor dem Plexiglas ein Beschleuniger zugesetzt worden war.

Zur Technik des Poliervorganges sind einige Grundregeln zu beachten, die für die Präparation eines gut geschliffenen Messers von großer Wichtigkeit sind. Nur mit einem gut polierten Messer können dünne und gleichmässige Schnitte ausgeführt werden, wobei der Erfolg gerade bei morphologischen Untersuchungen in hohem Maße von einer richtigen und genau durchgeführten Präparation des Messers abhängt.

Auch auf die Körperhaltung ist beim Polieren zu achten. Der Stuhl des Ausführenden muß so eingestellt sein, daß der Messerhalter -dieser besteht aus zwei vorne angeschliffenen Metallflächen, die durch Nieten zusammengehalten sind und in das zu polierende Messer eingespannt werden- , in die Mitte der Glasplatte zu liegen kommt, wobei die Vorderarme des Ausführenden leicht nach unten geneigt sind und die Oberarme senkrecht nach unten hängen. Die Bewegung des Messerhalters ist durch die vor-und zurückschwingenden Oberarme gewährleistet. Der ganze Körper des Ausführenden muß sich während des ganzen Arbeitsganges ruhig verhalten. Ferner ist während dieser Arbeit ein konstanter Druck der Schneide gegen die Glasplatte und ebenso entlang des ganzen Messers von großer Bedeutung. Der Druck der Finger auf den Halter soll zwischen 100-150 g liegen und sich während des ganzen Poliervorganges nicht verändern.

Die ganze Präparation des Messers umfaßt rund 20 Züge, und zwar 12 große-d.h. ca. 9 cm bei einer Beschleunigung von 1-2 cm/sec, wobei der erste Zug vom Körper weg ausgeführt wird-und weitere 6-8 kleine Züge von ca. 4,5 cm Länge mit derselben Beschleunigung.

Weiterhin ist besonders darauf zu achten, daß die Schneide des Messers immer mit größter Sorgfalt auf die Glasplatte aufgesetzt wird, damit nicht schon hier Schäden entstehen, die durch Polieren nicht mehr zu beheben sind. Das Resultat des Poliervorganges zeigt sich dann bei der Betrachtung des Messers in einem besonderen Lichtmikroskop, wobei die Schneide eines gut geschliffenen Messers als ganz dünner kontinuierlicher heller Strich zu sehen ist, während bei einem schlecht geschliffenen Messer der die Schneide darstellende Strich verschiedene Dicke und keine Kontinuität aufweist.

Ferner ist eine konstante Größe der angeschliffenen Fläche, Facette genannt, von mindestens 1 mm über die ganze Breite der Messerschneide hin von großer Wichtigkeit.

Das menschliche Spermatozoon zeigt in rund 800 elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die von mir angefertigt wurden, folgende, bisher noch nicht beschriebene morphologische Struktur. Der Zellkern ist im elektronenoptischen Bild eine homogene dichte Substanz, die keine spezifische Struktur erkennen läßt. Im Innern des Kernes, mehr gegen die Spitze zu, findet sich ein länglich ovales Gebilde, das im Elektronenstrahl kaum Massendichte aufweist und somit als Vakuole angesprochen werden kann. Der dichte Zellkern ist von einer Doppelmembran, die 140 Å dick ist, umgeben. Um den Kern herum legt sich in kontinuierlichem Übergang zum Halsteil hin eine ca. 500 Å dicke Hülle. Am vorderen Ende des Kopfes entspricht diese Hülle der galea capitis tierischer Samenfäden. Zum Nackenteil hin enthält sie einige "granulae", die in der Größe zwischen 0,05 - 0,2 µ schwanken und teils elektronenoptisch dicht, teils auch elektronenoptisch leer sind. Wie schon oben gesagt, dürfte es sich bei diesen "granulae" sicher um Mitochondrien handeln.

Vergleicht man mit diesen Ejakultionsspermatozoen die Schnitte von reifen Hodenspermien, so fällt als erstes auf, daß die Köpfe dieser Spermatozoen nicht die allgemein bekannte Birnenform aufweisen. Dies dürfte ohne weiteres verständlich sein, wenn man bedenkt, daß diese Spermatozoen im Lumen der Hodenkanälchen dicht gepackt liegen. Frei von diesem Druck nehmen sie dann die gleiche Form wie Ejakultionsspermatozoen an. Vergleicht man zum Beispiel Erythrocyten in vitro und in den Kapillaren liegend, so erhält man ähnliche Veränderungen, d.h. in den Kapillaren unterliegen die Erythrocyten,durch die Enge des Lumens bedingt, einem Druck, der eine Deformation

verursacht, in vitro behalten die Erythrocyten ohne weiteres ihre Discusform bei.

Bei reifen Hodenspermatozoen finden wir ebenfalls eine dichte Kernsubstanz, eine Kernmembran und eine diesen Kern umgebende Hülle. Ebenso ist eine "Vakuole" zu finden.

Betrachtet man den Samen von Bullen, so fällt im Schnitt als erstes die galea capitis auf, die, wie erwähnt, bei menschlichen Spermatozoen ohne Anwendung der Dünnschnittechnik nicht zu finden ist. Diese galea capitis zeigt sich sowohl an reifen Hodenspermatozoen, wie auch an Ejakulationsspermatozoen, und zwar mit der gleichen submikroskopischen Struktur.

Im elektronenoptischen Schnitt stellt sie sich als fast optisch leere Haube am Vorderende des Spermatozoonkopfes dar. Diese Haube wird umgeben von einer dickeren Doppelmembran, welche auch den übrigen Kopfteil umhüllt. Außerdem besitzt der eigentliche Zellkern eine einfache Membran.

Im Kernteil des Kopfes finden sich im Gegensatz zum menschlichen Samen nicht eine Vakuole, sondern mehrere.

An den Kern anschließend kommen einige granulae zur Darstellung, die aber noch zum Kopf gerechnet werden können. Möglicherweise sind diese granulae Mitochondrien.

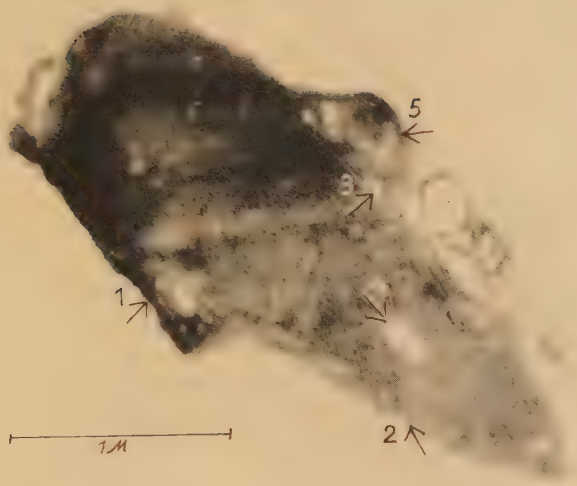


Abb. 1

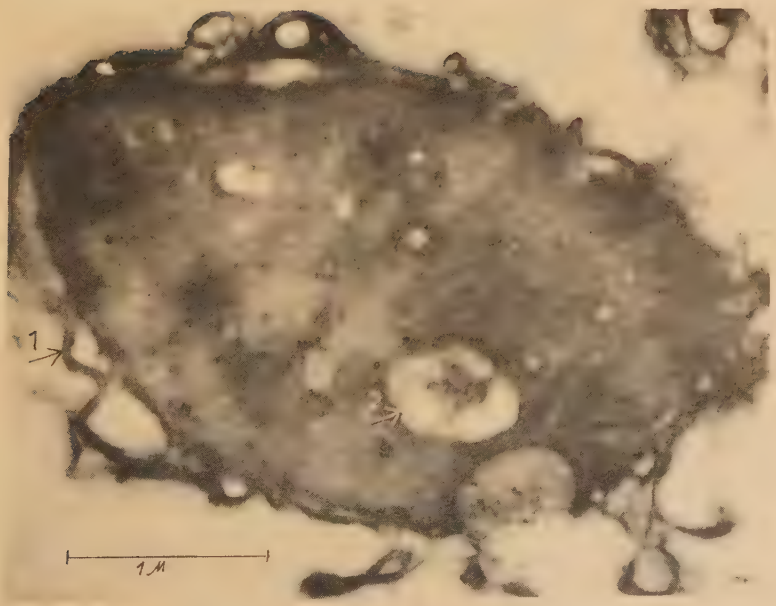


Abb. 2

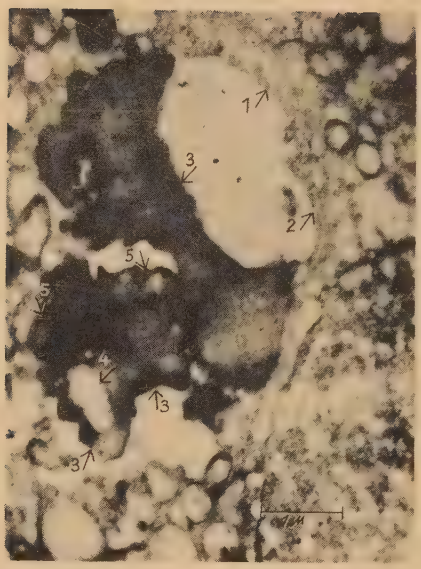


Abb. 3

Abb. 4

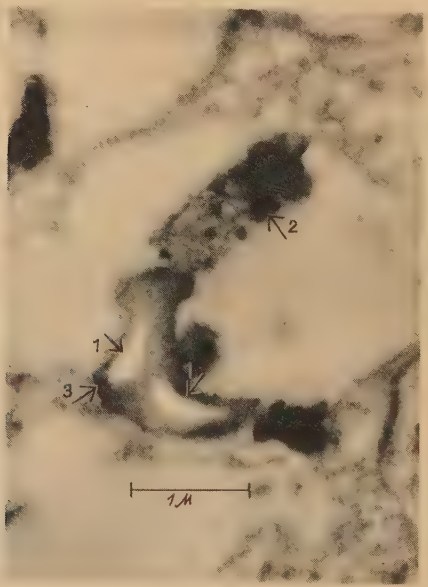


Abb. 5

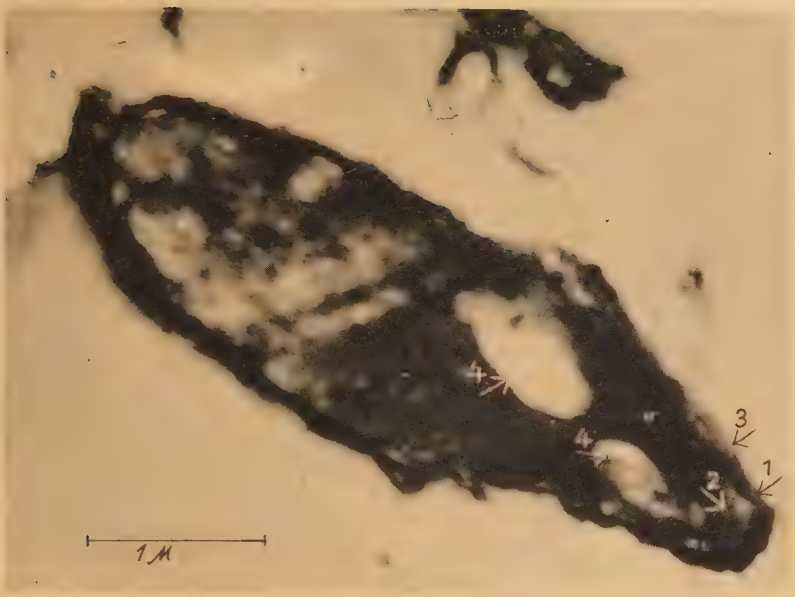


Abb. 6

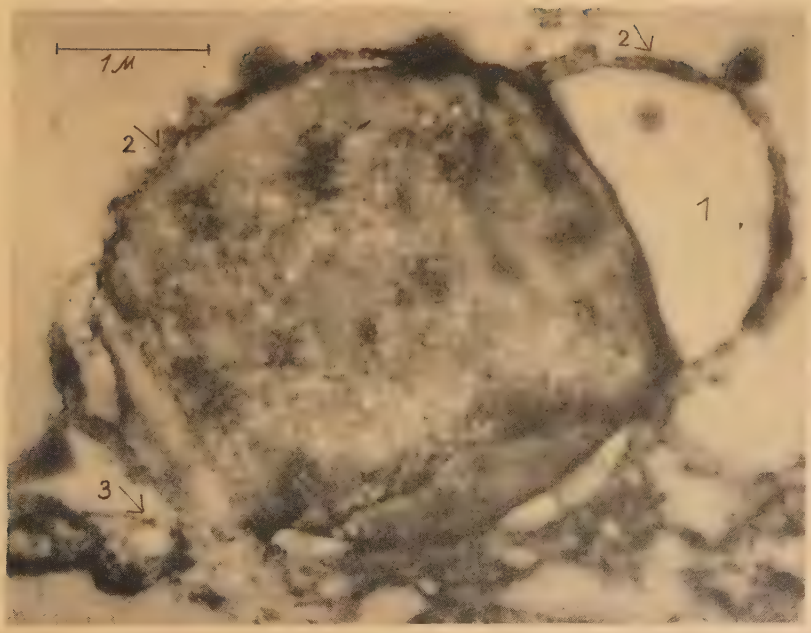


Abb. 7

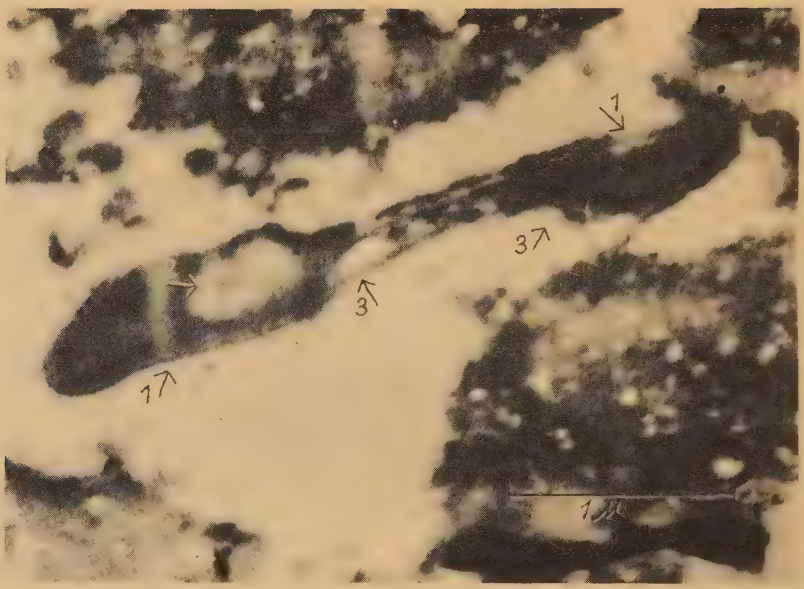


Abb. 8

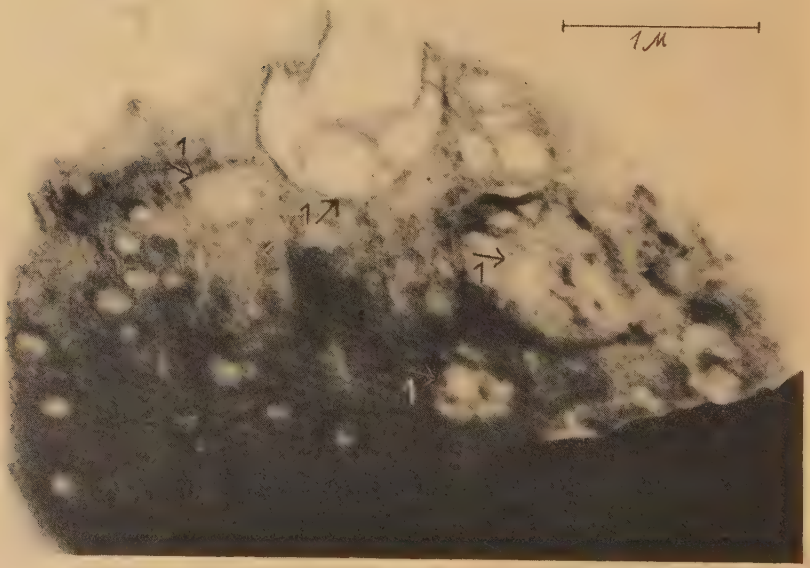


Abb. 9

Abbildung: 1

Längsschnitt durch menschliches Ejakulationsspermatozoon.

——→ 1 äußere Membran, bildet die Kopfhaube.

– – → 2 Doppelmembran, welche in den Halsteil übergeht.

——→ 3 Kernmembran.

— → 4 angeschnittene Vakuole.

- · → 5 Mitochondrium.

Vergrößerung: 31 000 x

Abbildung: 2

Längsquerschnitt durch menschliches Ejakulationsspermatozoon.

——→ 1 äußere Doppelmembran.

——→ 2 angeschnittene Vakuole mit filamentösem Inhalt.

Vergrößerung: 29 000 x

Abbildung: 3

Hodenkanälchen mit menschlichem Spermatozoon.

——→ 1 und ——→2 Epithelzelle des Hodenkanälchens.
Oberes Spermatozoon,hier mehr im Längsschnitt getroffen, unteres im Querschnitt.

——→3 äußere Membran des Spermatozoons.

——→4 angeschnittene Vakuole.

——→5 Mitochondrien.

Vergrößerung: 15 000 x

Abbildung: 4

Spermatozoon im Kanälchenlumen, im Querschnitt getroffen.=——→1

——→ 2 Spermatozoon im Kanälchenlumen in Längsschnitt.
Deutliche Unterscheidung von Kopf-——→3 Hals-——→ 4
und Schwanzteil——→ 5

——→6 Mitochondrium.

Vergrößerung: 21 000 x

Abbildung: 5

Spermatozoon im Längsschnitt.

Deutliche Darstellung von: Vakuole ——→ 1
Mitochondrium ——→ 2
u. äußere Membran ——→ 3

Vergrößerung: 21 000 x

Abbildung: 6

Hodenspermatozoon vom Bullen, Längsschnitt.

⟶ 1 und ⟶2 = galea capitis.

⟶3 äußere Doppelmembran.

⟶4 Vakuole.

Vergrößerung: 24 000 x

Abbildung: 7

Hodenspermatozoon vom Bullen, Längsschnitt.

⟶1 galea capitis im Längsschnitt.

⟶2 äußere Doppelmembran.

⟶3 Übergang von Kopf- zum Halsteil.

Vergrößerung: 19 000 x

Abbildung: 8

Längsschnitt durch Ejakulationsspermatozoon-Bullen-.

⟶1 äußere Doppelmembran.

⟶2 Vakuole mit Filamenten.

⟶3 ein Stück des Spermatozoonkopfes wurde beim Schneiden herausgerissen.

Vergrößerung: 31 000 x

Abbildung: 9

Schnitt durch den Kern eines Spermatozoons-Bullen-.

⟶1 reichliche Vakuolenbildung.

Vergrößerung: 26 000 x

Zusammenfassung

Die Einleitung bringt einen kurzen geschichtlichen Überblick über die Entwicklung der Spermatologie und eine Beschreibung des Elektronenmikroskopes sowie seiner Arbeitsweise.

Weiterhin wurden die bisherigen Ergebnisse vorwiegend ausländischer Arbeiten über elektronenmikroskopische Untersuchungen von Spermatozoen eingehend besprochen.

Die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen wurde durch die neuerdings vielfach diskutierte Frage gegeben, ob Hodenspermatozoen bei Verschluss der samenabführenden Wege für eine homologe Insemination verwendbar sind, und ob Ejakulations- und Hodenspermatozoen im elektronenoptischen Bild ein verschiedenartiges Aussehen, besonders im Hinblick auf ihr Entwicklungsstadium, erkennen lassen.

Da sich an den elektronenoptischen Aufnahmen keine sicheren morphologischen Unterschiede nachweisen liessen, wurden erstmals mit der von S c h u l t z - L a r s e n entwickelten Dünnschnittechnik Schnitte von Hoden- und Ejakulationsspermatozoen angefertigt.

In rund 800 elektronenoptischen Aufnahmen konnten auch bei diesem Verfahren rein morphologisch keine Unterschiede zwischen Hodenspermatozoen und Ejakulationsspermatozoen festgestellt werden, die auf eine noch nicht abgeschlossene Ausreifung hindeuten könnten.

Am Ende dieser Arbeit sage ich Herrn Professor Dr. med. H. Schuermann für die freundliche Überlassung des Themas meinen aufrichtigen Dank.

Ferner ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. C. Sonnenschein für die Genehmigung, im elektronen - mikroskopischen Labor des hygienischen Institutes arbeiten zu können, meinen verbindlichen Dank aussprechen zu dürfen.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. med. E. Mölbert und Herrn Dr. med. R. Doepfmer für ihre Hilfe in allen praktischen Fragen und für ihre tatkräftige Unterstützung.

Literatur

Baylor,M.R.B.,Nalbandov,A.,Clark,G.L.: Proc.Soc.Exper.Bio.& Med. 54:229,1943.

Blom,E.: Fertil.& Steril. 1:223,1950

Bretschneider,L.H.: Proc.Koninkl.Akad.v.Wetensch. (Amsterdam) 52:301,1949

Bretschneider,L.H.: Proc.Koninkl.Akad.v.Wetensch. (Amsterdam) 52:526,1949

Burton,E.F.,Kohl,W.H.: The Elektron Mikroscope.New York,Reinhold 1942

Clup,O.S.,Best,J.W.,J.Urol. 61:446,1949

Harvey,E.B.,Anderson,T.F.: Biol.Bull! 85:151,1943

Randall,J.T.,Friedlaender,M.H.G.: Experimental Cell Research 1:1,1950

Reed,C.I.,Reed,B.P.: Anat.Rec. 100:1,1948

Retzius,G.: Biologische Untersuchungen. Grsg.von G.Retzius. Vol. 1,1890; Vol. XIX, 1921. Stockholm 1890-1921.

Sanders,J.H.: West! J.Surg. 56:306,1948

Schmitt,F.O.,Hall,C.E.,Jakus,M.A.: Biol.Symposia 10:261,1943

Schnall,M.D.,Fertil.& Steril. 3:1,1952

Schultz,J.,MacDuffee,R.C.,Anderson,T.F.: Science 110:5,1949

Schultz,J.,Hammen,R.,Carlsen,F.E.: Fertil. & Steril. 5:5,1954

Seymour,F.I.,Benmoshe,M.: J.A.M.A. 116:2489,1941

Seymour,F.I.: Womans Med.J. 50:151,1943

Silverman,L.B.,Elliott,S.B. Greenfield,M.A.: Science 110:376,1949

Soderwall,A.L.,Blandau,R.J.: Science News Letter. 39:355,1941

Williams,R.C.,Wycoff,R.W.G.: J.App.Phys. 15:712,1944

Williams,R.C.,Wycoff,R.W.G.: Proc.Soc.Exper.Biol.& Med. 58:265,1945

Williams,W.W.: Fertil. & Steril. 1:119,1950

Wycoff,R.W.G.: Elektron Microscopy.New York,Interscience, 1949.

Zworykin,V.K.,Morton,G.A.,Ramberg,E.G.Hillier,J.,Vance,A.W.: Elektron Optics and the Elektron Microscope. New York, Wiley,1945.

L e b e n s l a u f

Am 17. März 1930 wurde ich in Bamberg als Sohn des damaligen Kommissärs der Polizei Lorenz R e i n l e i n und seiner Ehefrau Babette, geb. Streit, geboren.

Ab Ostern 1936 besuchte ich die Volksschule in Poppenlauer und trat 1941 in das humanistische Gymnasium Münnerstadt ein. Infolge Versetzung meines Vaters nach Mellrichstadt besuchte ich die Realschule in Bad Neustadt/Saale und legte dort im Sommer 1950 mein Abitur ab.

Im Wintersemester 1950/51 immatrikulierte ich mich als Student der Medizin an der Universität Erlangen. Im Sommersemester 1951 wechselte ich an die Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg und schrieb mich für das Studium der Zahnmedizin ein. Meine zahnärztliche Vorprüfung bestand ich im Februar 1953. Im September 1955 legte ich das zahnärztliche Staatsexamen ab. In den letzten 5 Monaten war ich mit der Fertigstellung dieser Arbeit beschäftigt.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Waldemar Reinlein

RUDOLF BAENE DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG